

栄養源としての酵母に関する遺伝学的研究

(第 4 報)

2 倍体酵母および半数体酵母における呼吸欠損変異誘発について

笠原 秀夫, 衣鳩 文恵

Genetic Studies on the Supply of Nutrition by Yeasts

Part IV

Induction of RD mutants in diploid yeasts and haploid yeasts

HIDEO KASAHARA and FUMIE IBATO

緒 言

4) 前報に於ては, 乳糖発酵性酵母 (*K. fragilis*) と非発酵性酵母 (7N) との各種糖酸酵性に関する相違を各正常菌と呼吸欠損株について比較検討したが, *K. fragilis* の呼吸欠損株がその後突然変異を起したので, *K. fragilis* の安定な呼吸欠損株を作る事を目的として, 色々の誘発剤を用い, 7N 酵母についても同時にそれぞれの呼吸欠損株を作り, 酸酵性のみならず, 呼吸能及び巨大集落並びに細胞の形態に関して2倍体と半数体の場合を通じて比較究明し度い。

酵母の呼吸欠損株には核性のものと細胞質性のものとがあるが, 酵母は細胞質性の ρ 因子といわれる因子をもっていて, この因子の欠損或は変異した呼吸欠損株はチトクロームCはもっているが, チトクローム a および b を失っている。その点では核性の呼吸欠損変異株の表現型と同じである。 ρ 因子は細胞核の染色体とは別個に自主的に増殖するので, その増殖が細胞分裂と正確に同調していないためか, 増殖中に ρ の呼吸欠損細胞を生じることがある。このものは核性の呼吸欠損変異株と異なり, 一度 ρ となったものは一般に, ρ に戻ることはない。 ρ 呼吸

欠損変異株を生じる頻度は株によっても違うが, 普通は1~2%で稀に40%の高率の変異を生ずることがあり, この様な株は unstable strain (不安定株) と呼ばれている。

ρ 変異株を高頻度に誘発する薬剤としてはアクリフラビンが有名であり, これを用いると高率で ρ 変異を誘発するといわれている。

この他にはエチジウムブロマイド, パラニトロフェノール或は 4-ニトロキノリンオキサイド等が挙げられる。

実 験 方 法

1. 供試酵母

協会7号酵母 (*S. cerevisiae*) 7N: 財団法人日本醸造協会が頒布している代表的清酒酵母

協会7号酵母 (*S. cerevisiae*) の半数体: 7H (7ND)

Kluyveromyces fragilis (F3-5): 財団法人醸酵研究所から分与された乳糖酸酵性の酵母

S. carlsbergensis Br1: 下面醸酵ビール酵母 (西独ミュンヘン醸造試験所から供与された。)

2. 呼吸能欠損細胞誘発の方法

呼吸能欠損 (respiratory deficient =

RD)変異株誘発剤としてアクリフラビン(AF)エチジウムブロマイド(EB),パラニトロフェノール(PNP)及び4.ニトロキノリンオキサイド(4NQO)を用いた。

何れの誘発剤の場合も同様であるが,供試酵母を麦芽汁10ml(試験管)に30℃72hrs前培養したものを遠心分離機にかけて酵母を分離し,この酵母を滅菌水で洗條してからまた遠心分離を行ない,これを3回繰返した酵母をB培地寒天平盤上に塗布展¹⁾開する,このB培地作成時に各誘発剤別にその所定濃度を添加しておくのである。

塗布を終ったシャーレは30℃の恒温器中に保ち,72hrs后に取り出して出現コロニーを観察して比較的小さなコロニー或は形態の異なるコロニーを白金線で釣上げて,麦芽汁の入った小試験管(3ml液¹⁾填)に接種する。

これを30℃恒温器中に14日位保ち,その間に皮膜もリングも形成しないものをRD株と見做し,更にOgurの簡易試験法,TTC重層試験および孢子形成試験を行なって確認する。

3. 麦芽汁の調製法

粉碎麦芽1kgに3倍量の水を加え,攪拌し乍ら加温して45℃1時間,65℃2時間,最後に75℃30分を要して糖化を行ない,汙紙で汙過して汙液に,1lに1個の割合で卵白を加え,泡が立たなくなるまで煮沸して清澄にし,再び汙紙で汙過したる後,糖濃度を17°B11gに調整する。

4. Burkholder らの培地²⁾(B培地)

glucose	20.0g
asparagine	2.0
KH ₂ PO ₄	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.33

KI	0.1mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.04
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.02
H ₃ BO ₃	0.60
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.04
thiamine HCl	0.31
inositol	0.20
ca-pantothenate	1.000
pyridoxine HCl	0.20
p-aminobenzoic acid	0.05
nicotinic acid	0.20
biotin	2.0r

蒸留水を加えて1.000mlとする,固体培地とするときには寒天20gを加える。

5. Ogur の簡易試験法

呼吸能有無の判定にOgur⁷⁾のalkali production methodも採用した。この方法は次の如き組成の培地を作り,その5mlを内径1.7mm,高さ5cm長さ1.5cmのL型試験管に入れ,加圧滅菌したものに,予め斜面培養してある供試酵母の1rich loopを接種し,30℃で試験管の長さの方向に振盪(振幅1.7cm,120r.p.m)し乍ら培養すると,呼吸能のあるものは5日以内に赤色に変わるというのである。

Respiration test medium

glucose	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.05g
peptone	0.2g
Na-acetate	0.4g
yeast extract	0.01g
metal solution	0.1g
0.1% phenol red	3g

H ₂ O	100ml
pH	6.5
metal solution	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.27mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.883mg
CaSO ₄ · 5H ₂ O	0.253mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.99mg
H ₂ O	100ml

6. 胞子形成試験

供試酵母を1白金耳試験管内の17°B11g麦芽汁10mlに接種，30℃，48時間培養し，上澄液を傾斜して排除し，沈澱酵母に滅菌水10mlを加えかくはん洗條後遠沈管に移し，遠心分離機にかけ，管底の酵母を滅菌ピペットで吸い取り，試験管内の胞子形成培地（0.4%酢酸曹達寒天斜面）に塗布する，これを30℃で48時間保存して胞子の形成を待つ。RD酵母は胞子を形成しない。

7. TTC法による集落(コロニー)の呈色試験⁸⁾

この方法はOgur, st. John 及び Nagai 等の研究によるもので，1%のブドウ糖を含むペプトン酵母エキス液寒天平板培地(TTC基礎培地)上に約100個の供試酵母細胞を展開培養して，コロニーが発生してから2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride を1ml中に5mg含む1.5%の寒天培地(TTC培地)を重ねる，そこでコロニーは1～3時間以内に深紅色(Red)乃至淡赤色(Pink)に変わる。然し炭水化物を資化出来ないコロニーには色の変化がない。

例えば *S. cerevisiae* のRD酵母は呈色しない。

8. β-アラニン培地における生育試験¹⁰⁾

β-アラニン培地は協会7号酵母の検出培地として用いられるもので，無機N源培地において，パントテン酸をβ-アラニンで代替したもので，7号酵母は25℃では増殖出来るが35℃では増殖出来ない。

9. 巨大集落(giant colony)の作成

培地には10°B11g 麦芽汁を用い，これに15%ゼラチンを添加して加熱ゼリー状にしてから普通はシャーレに無菌的に流し込むのであるが，培養中にシャーレの隙間から汚染空気が浸入する危険があるので，特製の培養瓶⁵⁾を用いた。この瓶を予め綿栓乾熱滅菌したものの中に，培地を流し込み(約20ml)これを蒸気滅菌して後1週間室温で乾かしてから，この表面に無菌的に，予め液体培養した供試酵母菌液を白金線の先端で中心に軽く微量接種する。これを20℃の恒温器に入れ，培養30日後に取り出しその模様を観察写真撮影した。

10. 糖の酸酵性試験

各種糖類に対する酸酵試験をペプトン1%酵母エキス(粉末)0.5%これに目的の一つの糖を2%含ませたものを試験培地(3ml)としてDurham tube³⁾を用いて行なった。即ち一つの試験管内に逆さに入れてある細試験管がその糖で充たされていて，この親試験管に酵母を接種し，若し目的の糖を酸酵すれば逆試験管にガスの気泡が貯留することにより酸酵性の有無を判定できる。

11. 酵母の酸酵能呼吸能の測定

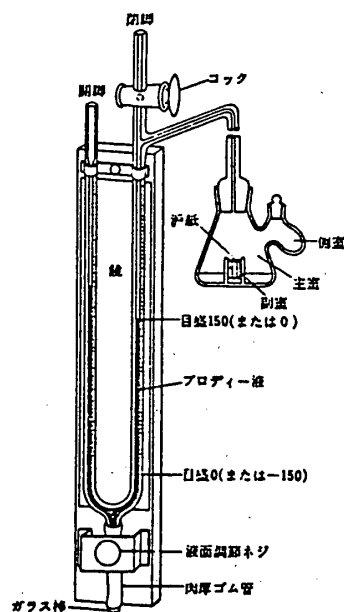


図-1

ワールブルグ検圧計¹⁾を使用し(図1),酵母の浮遊液を用いて呼吸による O_2 呼吸及び CO_2 放出を測定した。その方法を示すと、麦芽汁寒天斜面(10ml)に $30^\circ C$ 48時間前培養した菌苔を0.9%の生理食塩水で集菌し、3回遠心分離し乍ら洗滌したものを10mlメスコルベンに入れ定容としたる浮遊液を試料とした。

マンメーターの容器別組成は表1の通りで、Aでは呼吸中の CO_2 発生量を求め、Bでは呼吸による発生 CO_2 をKOH(気相との接触面を大にするため折りたんだ濾紙片をこのアルカリ中に浸しておく)に吸収させて、 O_2 吸収量を単独に測るのが目的である。

Cはブドウ糖を添加しないで、供試菌の自家呼吸量を知るのに必要である。

Dは、測定中の温度や圧力の変動を記録するために準備しておく。

表1 マンメーター容器別組成

容 器		A	B	C	D
主室	菌 浮 遊 液	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	2.0 ml
	M/15リン酸緩衝液 pH5.29	0.5	0.5	0.5	
	H ₂ O	0.5		0.5	
側室	M/10ブドウ糖	0.5	0.5		
副室	15% KOH		0.5	0.5	

次に各容器をそれぞれ対応するマンメーターと気密に連結して、 $30^\circ C$ の恒温槽に入れ、約10分振盪して温度平衡に達した時点から測定を開始し、10分毎に各マンメーターの目盛を記録し1時間で測定を終る。試料の乾物量は、使用した菌浮遊液の残液から5mlを秤量管に採り、 $105^\circ C$ で乾燥して、その1/10に相当する。

呼吸速度を反応容器に入れた試料の量で割ったものがその試料の呼吸能で、次のように表示される。

Q_{O_2} = 吸収した O_2 の量(μl)/hr/mg(乾物酵母量)なお、この場合の排出 CO_2 の量は次の通りである。

Q_{CO_2} = 排出した CO_2 の量(μl)/hr/mg(乾物酵母量)

RQ(呼吸商)の表示は同一試料の Q_{O_2} で Q_{CO_2} を除いた商である。

醗酵による CO_2 の放出を測定するには、容器中の気相を N_2 で置換する必要がある。

置換の方法としては、真空置換の方法を採用した。

N_2 ガス気相中での CO_2 発生量の測定結果は、次のように表示される。

$Q_{CO_2}^{N_2}$ = 発生した CO_2 の量(μl)/hr/mg(乾物酵母量)

実験結果と考察

1. 協会7号酵母(7N)の呼吸欠損株作品

アクリフラビン(AF), エチジウムブロマイド(EB)及びパラニトロフェノール(PNP)を各単独に用いて、7N酵母の2倍体(2n)及び半数(n)についてRD株の作出を試みたが、各RD誘発剤の有効濃度とRD株発生率の関係は次の通りである。

表2 協会7号酵母とRD株誘発性

酵母 7N 有効性 RD株 誘発剤	2 倍 体		半 数 体	
	濃 度	RD発生率	濃 度	RD発生率
AF	4~1.2 γ /ml	52%	4~1.2 γ /ml	16%
EB	0.5mg~0.005 γ /ml	100%	7~3mg/ml	86.7%
PNP	72~54 γ /ml	3.8%	72~48 γ /ml	1.7%

上の表をみると、7N酵母の2倍体と半数体について、AFを用いた場合及びPNPを試みたる場合何れも2倍体の方がRD株を発生し易い、特にAFはPNPより2倍体に強力に働いている。これに

比べてEBの作用はやはり2倍体に強力に働き、1 mg~0.005 μ /ml で実に100%の成果を示しており、半数体に対しても86.7%であるが、特に2倍体に対しては非常に低濃度で効果のあることを示している。このように明らかに2倍体の方が半数体よりもRDを越し易いのは2倍体の方が半数体よりも細胞質因子が多いためにこのような著しい差が現われるものと思われる。

Mortimer⁹⁾によると、放射線の影響は2倍体は半数体より安定とされているが、RDでは核より細胞質のミトコンドリアが対象になるから2倍体の方が不安定なのであろう。

2. *K. fragilis*の呼吸欠損株誘発の試み

*K. fragilis*についてRDを誘発させるためにAF, EB, 及びPNPの3つをシャーレ中で色々な次の濃度のB培地寒天上に塗布展開し、出現した各コロニーについて小試験管麦汁培養を試みた。然しこの範囲の濃度ではRD株は出現しなかった。

表3 *K. fragilis* に対するRD誘発試験 (B培地使用)

A F	濃度mg/ml	0.24	0.12	0.06	0.03	0
	コロニー出現 { 正常 RD	0 0	101 0	192 0	224 0	187
E B	濃度mg/ml	0.5	0.05	0.015	0.005	0
	コロニー出現 { 正常 RD	0 0	0 0	10 0	142 0	159
PNP	濃度mg/ml	0.2	0.1	0.01	0.001	0
	コロニー出現 { 正常 RD	0 0	0 0	154 0	150 0	191

表4 4NQOによるRD誘発試験

		4NQO濃度 μ /ml	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0
K. fragilis	出現コロニー数	0	18	17	93	205	404	421	
	変異コロニー数	0	0	3	0	0	0		
7 N	出現コロニー数	0	0	0	0	0	43	129	
	変異コロニー数	0	0	0	0	0	2		

以上のようなわけで、これら3種の薬品を用いてRDを誘発させることは困難と考え、次の如くK. fragilis に対しては4NQOを試みることにした、対照には7N酵母の2倍体を使用した。なおK. fragilis はホモトリックであり、今迄に単孢子分離できなかったのが今回も2倍体のまま使用した。

4NQO試験の結果得られた変異株は、RDか否か慎重に検討したところ、7Nの2ケは完全なRD株であったが、K. fragilis の2ケは何れもセミRD株であった〔表4〕。

3. 正常菌株と呼吸欠損菌株の生長力比較

供試酵母としては次の菌株を用いた。

正常菌株 { 7N (協会7号の2倍体)
7H (協会7号の半数体)
K. fragilis (2倍体) = F

呼吸欠損菌株 { NA = AF により得られた7NのRD株
NE = EB " " "
NP = PNP " " "
NQ = 4NQO " " "
HA = AF " 7H "
HE = EB " " "
HP = PNP " " "
FQ = 4NQO " { K. fragilis
セミRD株

培地にはB培地を用い、その10mlを試験管に入れ、滅菌後各試験管別に供試酵母(麦汁寒天斜面に30℃培養48時間目のもの)1白金耳(乾物として1mg相当)を接種して30℃で72時間培養した(途中24時間目と48時間目に試験管を振盪して沈澱酵母を均一に浮遊させた)。その後これを水洗し乍ら遠心分離(3000r.p.m)して沈澱酵母を集め秤量管に採り乾物量を求めた。なお、酵母分離後の廃液の糖分(直接還元糖)をベルトラン氏法で定量した。その結果は表5に示す。

表5 RDと生長力との関係

菌 種		菌 体 収 量			残糖 %
		mg	比(1)	比(2)	
7 N	2 倍 体	16.7	100	100	0
	R D	NA	/	52.7	0
		NE		59.9	0
		NP		48.5	0
		NQ		41.3	0
	半 数 体	14.1	84.4	100	0
K. fragilis	R D	HA	/	66.7	0
		HE		65.2	0
		HP		82.3	0
	2 倍 体	6.8	40.7	100	0
	セ ミ R D	5.2	/	76.5	0.4

第5表を通して観察すると、収量比(1)では7N酵母の2倍体(正常)の収量を100とした場合の半数体(正常)の収量は84.4%で、やはり半数体の生長力は劣っていることがわかる。

次に収量の比(2)では7Nの2倍体を100としてそのRD株の生長は60%にも達しない、特に4NQOによるRD株は40%程度であり、4NQOは強力なRD誘発剤であることが窺える。半数体での各RD誘発剤の作用は、それぞれ相当する2倍体の収量に比較してAFでは10%、EBでは6%、PNPでは30%位高く、半数体の方がRD変異を受けにくいことを示している。

次にK. fragilis の2倍体(正常)の収率は7Nのそれと比べて40.7%で非常に少ない。然しそのセミRD株は真のRDではないために親の正常菌の76.5%で左程生長力が劣っていない。

なお、参考のために、各廃液の残糖をベルトラン氏法で定量したが培養時間が長かったせいか、残糖はK. fragilis のセミRD株が、0.4%残っていただけで、他の廃液では何れも0であった。

以上は正常菌とRD菌との生長力の比較をしたも

ので、これによるとRD株の活性度は2倍体の場合に於けるより半数体に於けるものの方が収率がやや優れている。

Sarachek⁹⁾によると50%死滅に要する放射線量は2倍体の方が半数体の3倍で900 Dose(ergs/mm²)と称しているが、RDは多くの場合細胞質の変異であるのでRD誘発剤に対しては逆に半数体の方が安定なのであろう。

4. 正常菌株とRD株の呼吸能及び醗酵能の比較

酵母は品種の相違許りでなく、同じ品種でも培養条件によって、呼吸能及び醗酵能は変るものであるが、同一品種の2倍体(2n)或は半数体(n)にRDを誘発させたらその影響は如何であろうか、実験の結果をまとめると表6の通りである。

この表で7N(2n)と7H(n)を比較すると、

Q_{O₂}とQ_{C_{O₂}}は7Nの方が高いがRQでは7Hの方が低い即ち半数体の方がより呼吸型である。

7Nの正常株とそのRD株をQ^{N₂}_{C_{O₂}}で醗酵能を比較すると2倍体には違いないが、RD株の方が何れも高い、即ちRDのためにそれだけ糖が醗酵に多く消費されていることを示している。7Hの正常菌とそのRD株とのQ^{N₂}_{C_{O₂}}の比較でも同じ理由でRD株の方が何れも優れている。

K. fragilis とそのセミRD株(FQ)とを比較すると、Q_{O₂}もQ_{C_{O₂}}もFQの方が低い、RQはFQの方が高く、呼吸系酵素が若干残っていて、親株のK. fragilis に比してセミRD株であることが明らかである。Q^{N₂}_{C_{O₂}}もFQの方が多い。

Br1(下面ビール酵母)は醗酵力の強い酵母として代表的であるので、対照としてそのQ_{O₂}、Q_{C_{O₂}}などを示した。

表6 正常菌株とRD株の呼吸能及び醗酵能

				Q _{O₂}	Q _{C_{O₂}}	R Q	Q ^{N₂} _{C_{O₂}}
協 会 七 号 酵 母	2 倍 体	正 常	7 N	1.0	2.7	2.7	3.0
		R D 株	N A				4.6
		"	N E				5.1
		"	N P				5.0
		"	N Q				3.1
	半 数 体	正 常	7 H	0.6 9	1.0 5	1.5 2	1.4
		R D 株	H A				2.0
		"	H E				3.7
		"	H P				1.7
K. fragilis		正 常	F	2.2 2	3.1 2	1.4 1	0.5
		セミ RD	F Q	0.8 4	1.7 3	2.0 6	1.3
ビ ー ル 酵 母		正 常	B r 1	0.2 7	2.4 7	9.1 5	8.7

(注) 斜線の部分は呼吸欠損のため数字が出ない。

5. RD と糖の醗酵性との関係

RDを中心にして、7 N 酵母（2 倍体と半数体）、Kfragilis（2 倍体とセミ RD 株）及びビール酵母 Br1（2 倍体）の糖醗酵性を一括すると表 7 の通りで、これを考察すると、7 H は親株 7 N がマルト

ース醗酵性（MA）であるに拘らずマルトース非醗酵性（ma）であるが、これは MA 因子が多因子であり、7 H は半数体であるので、その因子の幾つかが孢子形成の際に形質分離で失われたためであろう。

然し 7 H の RD 株の一つ H E が M A であるのは、

表 7 RD 株 と 糖 の 醗 酵 性

種 別				糖 類		GI	Fr	Ma	La	Ga	In	Me	Tr	Su
協 会 七 号 酵 母	2 倍 体	正 常	7 N	+	+	+	—	+	—	—	—	+	+	
		R D 株	N A	+	+	+	—	+	—	—	—	+		
		"	N E	+	+	+	—	+	—	—	—	+		
		"	N P	+	+	+	—	—	—	—	—	+		
		"	N Q	+	+	+	—	+	—	—	—	+		
	半 数 体	正 常	7 H	+	+	—	—	+	—	—	—	+	+	
		R D 株	H A	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	
		"	H E	+	+	+	—	+	—	—	—	—	+	
		"	H P	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	
K. fragilis		正 常	F	+	+	—	+	+	+	—	—	+		
		セミ RD	F Q	+	+	—	+	+	+	—	—	+		
ビ ー ル 酵 母		正 常	B r 1	+	+	+	—	+	—	+	—	+		

Ma = maltose Me = melibiose Tr = trehalose Su = sucrose Gl = glucose
Fr = fructose Ga = galactose In = inulin

元来 E B は D N A と結合し細胞の増殖を伴はなくても RD を起させる性質のものであり、一方マルターゼはその活性には細胞膜の透過性が問題になるので、この細胞の顕微鏡写真をみると、H E は親の 7 H ばかりでなく、H A、H P よりも細胞が大きいので、細胞膜の透過性が良くなったのではないと思われる。そのために H E の細胞では ma が M A になったのであろう。ガラクトース醗酵性では N P と H A と H P が RD のためにガラクトース醗酵性を失っているが、ガラクターゼは元来適応酵素であるために、

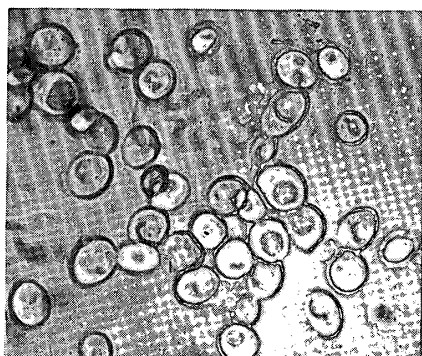
細胞質が関係しているので、RD の影響を受けてガラクトース非醗酵性になったのであろう。

分類学上ラクトースを醗酵する酵母はマルトースを醗酵しないし、マルトースを醗酵する酵母はラクトースを醗酵しないとされているが、前者の例は K. fragilis であり、後者には 7 N 及び Br1 がみられ、この性能は RD によって変っていない。

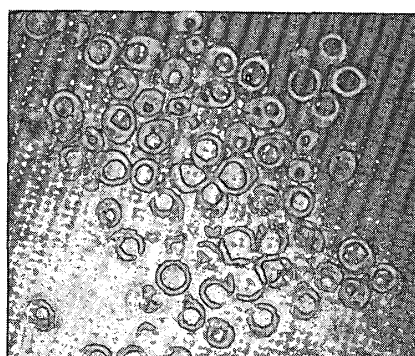
トレハロースの醗酵性は 7 N 及び 7 H にみられるがその RD 株は何れもその性能を失っている、これはトレハロースの醗酵には細胞質が関係しているた

二倍体の列

半数体の列

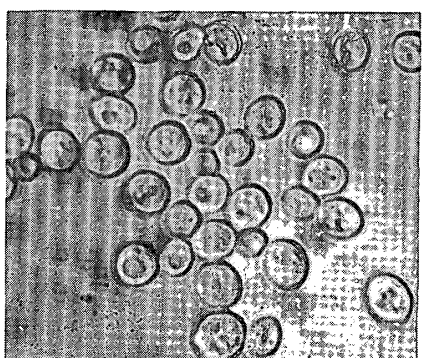


7N

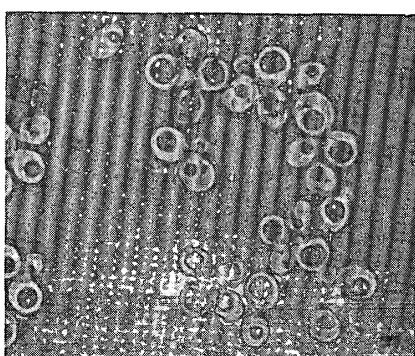


7H

正常株

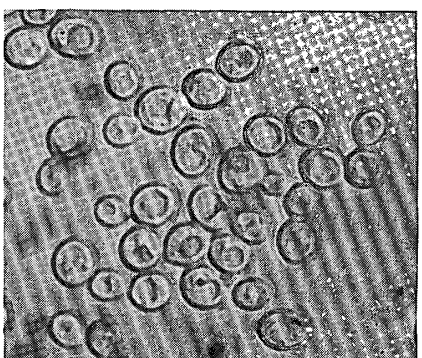


NA

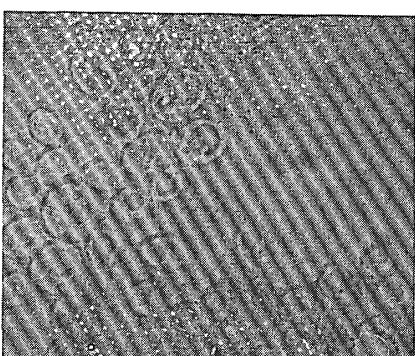


HA

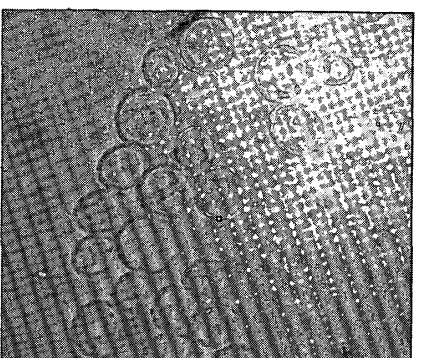
呼吸欠損株



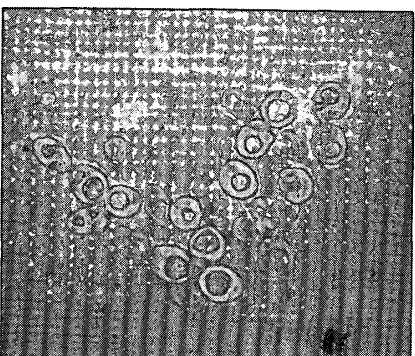
NE



HE



NP



HP

図2 協会7号系酵母の細胞(×1600)

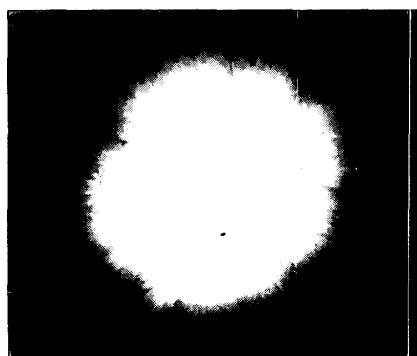
二倍体の列

半数体の列

正常株

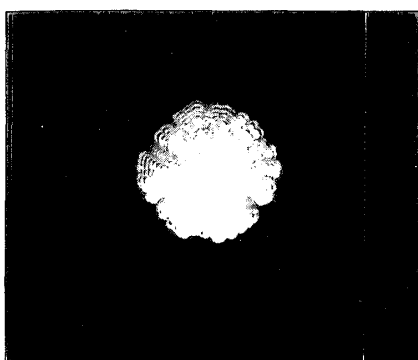


7N

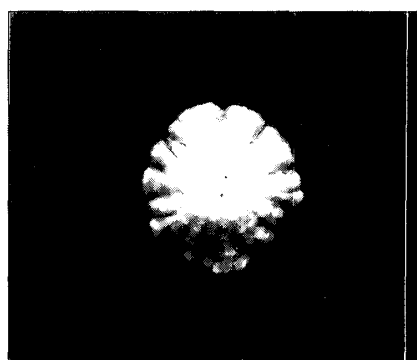


7H

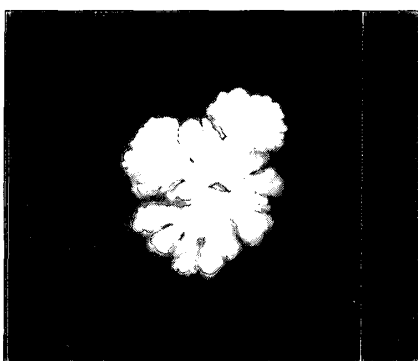
呼吸欠損株



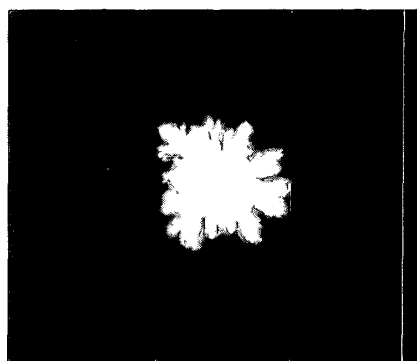
NA



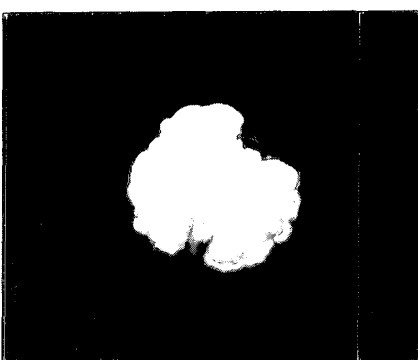
HA



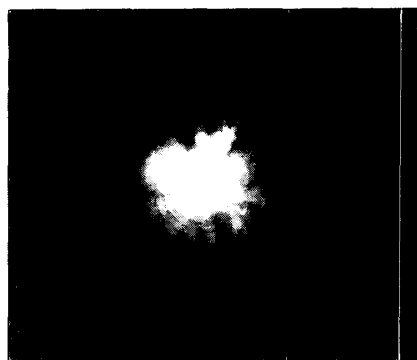
NE



HE

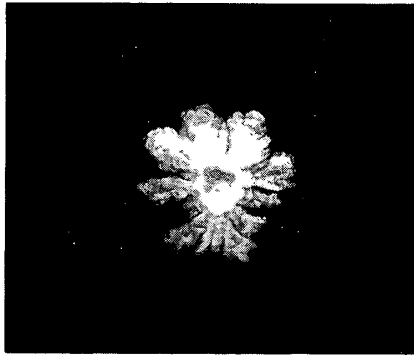


NP



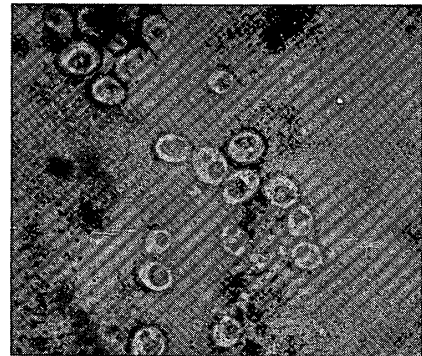
HP

図3 協会7号系酵母の巨大集落

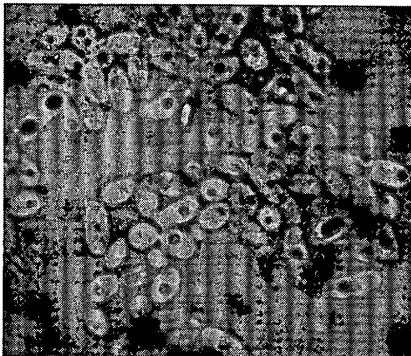


NQの巨大集落

協会7号
(7N)

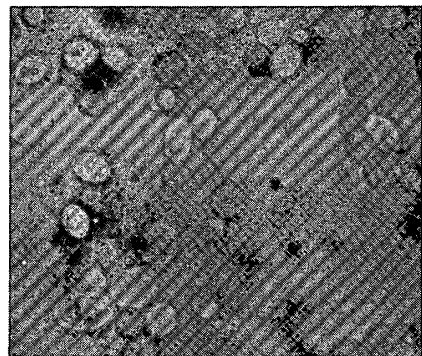


変異株の細胞(NQ)

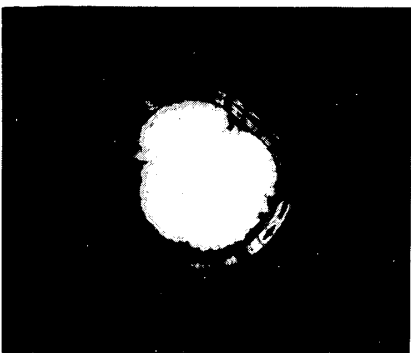


正常株 (F)

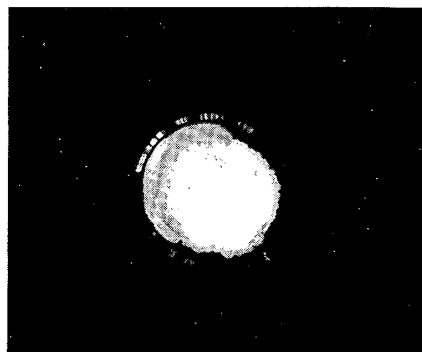
K.fragilis



変異株の細胞(FQ)

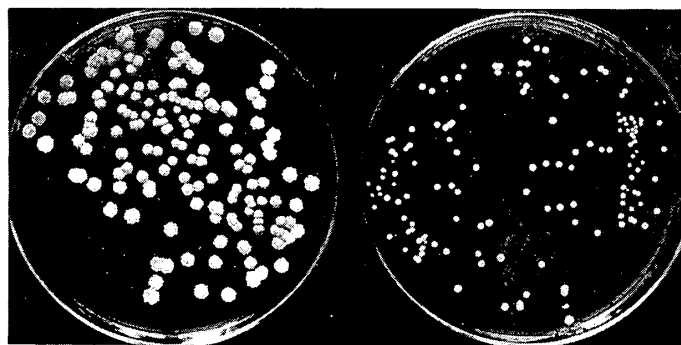


FQの巨大集落



Fの巨大集落

正常株
(F)



セミ
RD
株
(FQ)

麦汁寒天上に同時に個々に分散生長させた細胞の小コロニー(*K.fragilis*系)

図4 4NQOによる呼吸欠損

めと思われる。

6. 各種酵母の性能とRDとの関係

表8をみると、協会7号酵母(7N)のRD株には次の特長が明示されている。

① 麦汁培養で皮膜もリングも形成しない。

② OgurのAlkali Production Testで赤変しない。

③ TTC重層試験でコロニーが白色。

④ β アラニン培地で35℃で正常菌と同じく、生育しない。(7N酵母のメルクマールである)

表8 RDと諸性能との関係

種 別		項 目	麦汁培養で皮膜形成	Ogurの試験	TTC重層試験	β アラニン試験	孢子形成
7	N	2倍体	+	red	red	—	+
		RD	NA	—	yellow	white	—
			NE	—	"	"	—
			NP	—	"	"	—
			NQ	—	"	"	—
		半数体	+	red	red	—	—
		RD	HA	—	yellow	white	—
			HE	—	"	"	—
			HP	—	"	"	—
K. fragilis		2倍体	+	red	pink	+	+
		セミRD	±	brown	"	+	±

⑤ 孢子を形成しない。

これに対して、K. fragilisのセミRD株はそれぞれの表現力は、親株に比較して弱くてもnegativeになることはない。

7. 協会7号酵母(7N)のRDと細胞の形態

図2をみると、半数体7Hの細胞は2倍体7Nより一般に小さい。然しRDの細胞はその親株のRDよりも必ずしも小さくない。例えばNPの細胞は7Nより大きいし、HEも7Hより大きい。その他のRD細胞は殆んどその正常株と大体同じ大きさである。むしろ小さいものはない。然し実際の生長力は2倍体は半数体より大で、正常株はそのRD株より優れている。

8. 協会7号酵母(7N)のRDと巨大集落の模様

図3によると、2倍体7Nと半数体7Hとを比べて7Nの方が彫りが深く立体的であるが、7Hの方は模様は似ていても平面的である。RD株の方はNAとHAは同心円の模様が似ており、NEとHEは何れもカリフラワー状であり、NPとHPは同心円と花冠を合せたような形状で似ている。即ちAF、EB及びPNPはそれぞれ特長ある模様を形成するらしい。

9. K. fragilisの細胞とコロニーの形態

図4ではK. fragilisの細胞やコロニーに対する4NQOの影響を示してあるが、4NQOは完全

なRD株を作るには到らなかったが、正常株には長い細胞が多いが、FQには殆んどみられない。巨大集落はFもFQもゼラチンの中に食い込む性質があり、且つ平面的で特徴があまり鮮明でない。然し協会7号(7N)に対しては噴火口状の立体構造を示した。

最下段のシャーレの中の麦汁寒天上の*K. fragilis*の個々の細胞の小コロニーでは正常株Fは大きく周辺に凹凸があるのに対し、RDのFQではコロニーが小さく周辺も滑らかである、即ち明らかに形態上にも正常株とセミRD株の相違が現れている。

要 約

(1) RD誘発剤としてAF、EB及びPNPを使用して、協会7号酵母(7N)の2倍体及び半数体にRD変異株作出を試みたが、AF及びPNPは殆んど同じ濃度で2倍体に対する方が半数体に対するよりも2倍以上の効果があり、特にEBは0.5mg~0.005 γ /mlで100%の効果があるのに対し、半数体では7~3mg/mlで86.7%の効果があるにすぎない。

(2) *K. fragilis* に対してはAFもPNPもEBもRDを誘発する効果がなく、0.8~0.1 γ /mlの場合に737ケのコロニー中で3ケのセミRD変異株が現れただけである。

(3) RD誘発剤はその種類により、また相手の酵母の品種により、或はそれが2倍体か半数体かによってその効果が異なる。

(4) 7N酵母の2倍体と半数体について、それぞれのRD株をAF、EB、PNP及び4NQOで作り、各々の生長力を比較したが、何れも親株よりは劣るが、半数体でのRD株の方が2倍体のRD株よりも生長力が良い、則ちRD誘発率の良い方が生長力が劣っている。

(5) RQは7N(2倍体)の方が7H(半数体)より高い、即ち呼吸能が弱い。 $Q_{CO_2}^{N_2}$ は7Nの方が7Hより高い、またそれぞれのRD株でも7N系の方が7H系より高い、且つ各々の親株より高い。

(6) *K. fragilis* の4NQOによるセミRD株は、その親株より Q_{O_2} も Q_{CO_2} も少なくRQも弱い。然し $Q_{CO_2}^{N_2}$ は可成り高い、即ちセミRDの特長を示している。

(7) RD株と糖の酸酵性との関係では、7Nと7HのRDが何れも親株に反してトレハロースの酸酵性を失っている。またNPとHA、HPのようにガラクトースの酸酵性を失っているものがある、これはそれらの糖の分解酵素系が細胞質に関係があるためと思われる。また反面HEのようにマルトースの酸酵性を回復するものもあるがこれはEBは細胞質でなく核のDNAと結合する性質のためにこのような変異が生ずるのであろう。

(8) RD誘発剤は酵母の巨大集落の模様或は細胞の形状大きさにも変化を及ぼすことがあろう。

本研究に当り、財団法人日本醸造協会研究室の吉田清氏の御協力を厚く感謝致します。

文 献

- (1) 秋山裕一：新酒造技術醸協出版，P112(1970)。
- (2) BURKHOLDER, P.R., et al.: Bulletin Torrey Botanical Club, No. 70, 372 (1943)。
- (3) CARL C. LINDEGREN: The yeast cell Its Genetics and Cytology, 11-9 (1942)。
- (4) 笠原秀夫 益子雪枝：聖徳栄養短大紀要 9,23 (1978)。
- (5) 笠原秀夫：聖徳栄養短大紀要 8,23 (1977)。
- (6) MORTIMOR, R.H.: Rad, 9,312 (1958)。
- (7) OGUL M, LINDEGREN, G and LINDEGREN, C.C.: Jour. of Bact, 68, 391 (1954)。
- (8) OGUR, M. R. St. JOHN NAGAI: Science, 125, 928 (1957)。
- (9) SAYACHCK. A. CYTOLOGIA, 19, 77 (1954)。
- (10) 菅間誠之助 他：醸協, 60, 453 (1965)。
- (11) 吉川春寿 他：ワールブルグ検圧計(化学の領域増刊13) 南江堂(東京)(1954)。